

FACULTAD DE CIENCIAS
GRADO EN BIOLOGÍA
TRABAJO FIN DE GRADO
CURSO ACADÉMICO 2017-2018

TÍTULO:

**MODULACIÓN DE LA MORFOGÉNESIS EN MASAS DE NÓDULOS
MERISTEMÁTICOS DE *PAULOWNIA TOMENTOSA*.**

AUTOR:

MIGUEL ÁNGEL TORRÓ GUARDIOLA



RESUMEN

Paulownia tomentosa es una especie leñosa caracterizada por su rápido crecimiento y la buena calidad de su madera, que puede crecer en zonas muy diferentes y con grandes propiedades biorremediadoras. Cualidades que han convertido este árbol en objeto de interés para la industria e investigaciones científicas por sus múltiples propósitos y futuras aplicaciones de la biotecnología. A día de hoy la micropropagación es el método más efectivo para la producción a gran escala de este género. En la presente investigación se busca modular correctamente mediante el uso de Bencilaminopurina, masas de nódulos meristemáticos para lograr una mayor producción de material vegetal de cara a su uso en investigaciones y su posterior paso a la industria. Se estudiaron diversos parámetros para comprobar qué concentración de fitoregulador era la mejor para obtener una mayor calidad y cantidad de tallos a partir de estas masas. La concentración óptima para una correcta diferenciación de los clústers fue 1 mg/L de BAP. Concentraciones mayores a la anterior causaban una inhibición en la diferenciación de los clústers.

ABSTRACT

Paulownia tomentosa is a woody species characterized by its rapid growth and the good quality of its wood, which can grow in very different areas with great bioremediating properties. Qualities that have turned this tree into an object of interest for industry and scientific research for its multiple purposes and future applications of biotechnology. Today, micropropagation is the most effective method for the large-scale production of this genre. In the present investigation, the aim is to modulate correctly, through the use of benzylaminopurine, masses of meristematic nodules to achieve a greater production of plant material to use in research and subsequent passage to industry. Several parameters were studied to verify which concentration of phytohormone was the best to obtain a higher quality and quantity of stems from these masses. The optimal concentration for a correct differentiation of the clusters was 1 mg/L of BAP. Concentrations greater than 1 mg/L cause an inhibition in the differentiation of the clusters.

PALABRAS CLAVE

In vitro; *Paulownia tomentosa*; Bencilaminopurina; Micropropagación; Morfogénesis.

ABREVIATURAS

BAP; Bencilaminopurina. PTSCR; *Paulownia tomentosa* shoot cluster regulation.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 <i>Paulownia</i> . Taxonomía, distribución y características generales.....	3
1.2 <i>Paulownia tomentosa</i>	4
1.4 <i>Paulownia</i> . Aplicaciones industriales y forestales.....	5
1.4 Métodos de micropropagación.....	6
1.5 Reguladores del crecimiento In vitro.....	9
1.6 BAP.....	12
2. ANTECEDENTES Y MOTIVACIONES.....	13
3. OBJETIVOS.....	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
4.1 Obtención del material vegetal.....	15
4.2 Multiplicación y obtención de masas de nódulos meristemáticos.....	15
4.3 Modulación de las masas de nódulos meristemáticos.....	17
4.4 Análisis de los resultados.....	17
5. CRONOGRAMA.....	19
6. RESULTADOS.....	20
7. DISCUSIÓN.....	29
7.1 Longitud media de los tallos.....	29
7.2 Biomasa media de las masas de nódulos meristemáticos.....	31
7.3 Tasa de multiplicación media de los tallos reactivos.....	33
7.4 Número medio de hojas por tallo reactivo.....	34
8. CONCLUSIONES.....	35
9. BIBLIOGRAFÍA.....	36



1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Paulownia*. Taxonomía, distribución y características generales

El género *Paulownia* comprende un total de 9 especies y unos pocos híbridos que son nativos de China. Entre las especies de este género destacamos *P. albiphloea*, *P. australis*, *P. catalpifolia*, *P. elongata*, *P. fargesii*, *P. fortunei*, *P. kawakamii* y *P. tomentosa* (Zhao-Hua *et al.*, 1986). En el 2011 *Paulownia* ha sido incluida dentro de su propia familia, las **Pauloniaceas**, tras la realización de estudios filogenéticos y moleculares. Esta familia incluye tan solo el género mencionado y sus especies (Erbar and Gülden, 2011). Se trata de una especie caducifolia con una copa ancha, ramas que se desarrollan prácticamente de forma horizontal y hojas grandes de un color verde oscuro característico en forma acorazonada de entre 20 y 40 cm. de ancho en disposición opuesta. Como andota cabe destacar que *Paulownia* recibí este nombre en honor de Anna Paulowna (1795-1865), reina consorte de Holanda e hija del zar Pablo I de Rusia.

Todas estas especies las encontramos creciendo, tanto de forma silvestre como cultivada, en muchas partes del mundo aunque predominan China, Japón y todo el sudeste asiático de forma general. De forma emergente, ya se encuentran por toda Europa, norte y centro América y de igual manera en Australia. Esta amplia distribución es justificada debido a lo extremadamente adaptativo que es este género a los factores edáficos y climáticos. En china, por ejemplo, *Paulownia* se encuentra desde regiones a nivel del mar hasta alturas de casi los 1000 metros. (Zhao-Hua *et al.*, 1986). La mayoría de especies de *Paulownia* presentan cierta preferencia por suelos con alto grado de drenaje, debido a las características de sus raíces, que en su composición presenten un buen balance limo-arcilla-arena y que retengan la humedad en un grado aceptable. Precisan de bastantes nutrientes, decantándose por terrenos neutros o ácidos sin importar las grandes cantidades de calcio y magnesio (Melhuish, Gentry and Beckjord, 1990).

El rbol llegó a los Estados Unidos a mediados del siglo XIX en forma de semillas, utilizadas para empaquetar delicados platos de porcelana. Al desempaquetarlos, las diminutas semillas fueron dispersadas por el viento y fueron naturalizndose en todos los estados del este desde los que poco a poco se extendió por toda América a medida que se conocían todas sus propiedades (El-showk and El-showk, 2003).



Las características que han llevado a *Paulownia* a ser uno de los árboles más utilizados en silvicultura y uno de los principales focos de investigaciones agroforestales son principalmente; su madera ligera pero fuerte, posee una densidad muy baja; alrededor de 0.300 g/cm^3 lo que la hace muy ligera y le proporciona un secado muy rápido, con un corte muy vistoso. No se dobla ni se agrieta, por lo que es útil en la fabricación de muebles, embarcaciones, juguetes, madera contrachapada y cajas. Su resonancia sobresaliente lo hace adecuado para instrumentos musicales y también es apta para la producción biofuel y muchos otros usos. (Burger, 1989).

1.2 *Paulownia tomentosa*

Paulownia tomentosa (Thunb.) Siebold y Zucc. ex Steud, conocido también como árbol de la emperatriz o Kiri también es una especie originaria del centro y oeste de China donde tradicionalmente se ha utilizado en su medicina tradicional pero a diferencia de las otras especies, esta crece en Corea y Japón. (Zhao-Hua *et al.*, 1986).

En la actualidad, podemos encontrar esta especie cultivada por todo el mundo y suele estar presente como árbol ornamental en jardines y parques (Erbar and Gülden, 2011). A pesar de ello, a esta especie se la ha calificado como potencialmente invasiva fuera de su hábitat natural (Essl, 2007).

Esta especie alcanza en su etapa adulta una altura de entre 12 y 15 metros de altura. Las flores se producen a principios de primavera en panículas de 10-30 cm de largo, con una corola púrpura tubular que se asemeja a una flor en forma de dedal como se puede apreciar en la *Figura 1*. La fruta es una cápsula seca, que contiene miles de semillas diminutas, que se dispersan por anemocoria.

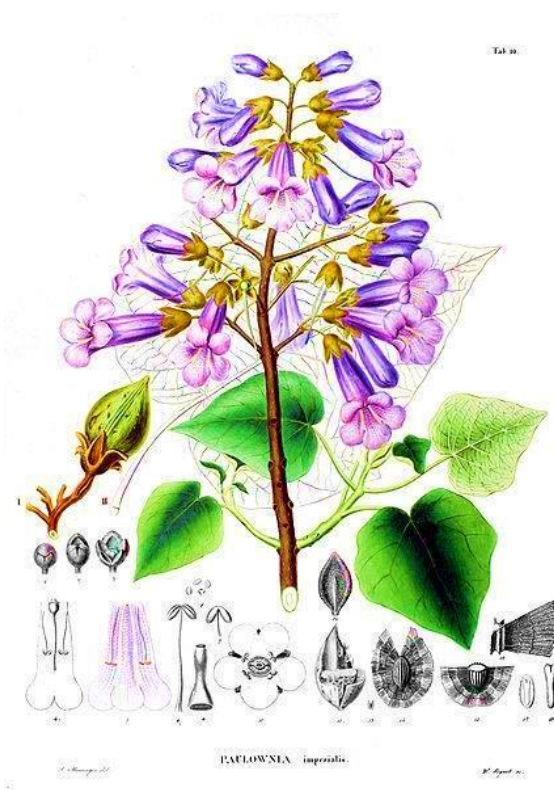


Figura 1: *Paulownia tomentosa*.

1.3 *Paulownia*. Aplicaciones industriales y forestales.

Se trata de un árbol de múltiples fines, utilizado en muchos tipos de industrias y con propiedades que lo convierten en un árbol muy prometedor en el futuro. El cultivo de *Paulownia* más allá de lo puramente ornamental y decorativo es ya una realidad.

Cada vez más cultivos se utilizan para la producción de biomasa para la industria eléctrica y es que las propiedades que presenta este género para ello son de gran relevancia: Enorme productividad dada su elevada tasa de crecimiento, una capacidad de adaptación sin precedentes a todo tipo de suelos (Bergmann, 1998), casi total ausencia de patógenos y una menor demanda de agua respecto de la que podemos encontrar en otros cultivos destinados a este mismo propósito con unos cuidados muy básicos con los que se obtienen grandes rendimientos (Ipekci and Gozukirmizi, 2003; Corredoira, Ballester and Vieitez, 2008; Doumett *et al.*, 2008). De igual manera, dada la elevada producción y su capacidad de fijar CO₂, presenta un gran potencial en programas de reforestación de tierras abandonadas o degradadas (Clatterbuck, 2005).



También en países como Australia este árbol se ha comenzado a cultivar dado su crecimiento y alto contenido en celulosa (440 g. cel/Kg) para solventar la demanda de madera (Beel *et al.*, 2005). Por los mismos argumentos se ha evaluado su rendimiento, con excelentes resultados, para la producción de biofuel y pasta de celulosa (López *et al.*, 2012). Este tipo de madera es muy ligera pero de gran resistencia, seca muy rápido sin deformarse o agrietarse. Es muy fácil de trabajar por lo que es idónea para tallar y posee grandes ventajas como aislante (Zhao-Hua *et al.*, 1986).

Tradicionalmente flores y hojas se han aprovechado para forraje de cerdos, ovejas y demás animales como fuente de grasas, azúcares y proteínas. Estas inflorescencias de gran tamaño también han sido utilizadas como fuente para la producción de miel y, junto con las hojas, componen un gran fertilizante dado su alto grado de Nitrógeno comparable a algunas leguminosas (Zhao-Hua *et al.*, 1986). En medicina, es utilizada para tratar diversas dolencias en la medicina tradicional china por sus propiedades curativas.

Por último cabe destacar que este género posee un gran sistema radicular con elevadas tasas de transpiración y que toleran muy bien las altas concentraciones de metales pesados tanto en cultivo hidropónico como en los suelos contaminados, lo que indica el potencial fitorremediador para una amplia variedad de metales pesados (Doumet *et al.*, 2008).

1.4 Métodos de micropropagación

La micropropagación podemos definirla como la propagación clonal de plantas como resultado de la proliferación de brotes cultivados *in vitro*. En el contexto de la producción vegetal esta técnica cuando se aplica permite producir unas cantidades muy grandes de planta en un espacio muy limitado sin importar la época del año, pudiendo controlar todos los parámetros ambientales (Temperatura, luz...) y en condiciones asépticas (Anjaneyulu, 2004).



En general los protocolos de micropropagación podemos dividirlos en **4 estadios**:

1. Inicio del cultivo a partir de tejido vegetal estéril.
2. Multiplicación y subcultivo del material vegetal.
3. Elongación y enraizamiento de los tallos desarrollados.
4. Aclimatación a las condiciones *ex vitro*.

Paulownia se propaga de forma natural por semillas que poseen un periodo de dormancia característico que provoca gran heterogeneidad entre sus poblaciones y a muchos problemas en su uso en silvicultura y demás industrias (Bergmann and Moon, 1997; Castellanos and Rodriguez, 2006). Es por ello que se precisa de la propagación clonal para evitar esa variabilidad que no nos interesa. Se puede propagar con estaquillas de raíz aunque es un método más lento y en las plantas adultas la formación de esos brotes adventicios en raíces disminuye (Burger, 1989).

Los principales tipos de micropropagación que existen en la actualidad son los que aparecen recogidos en la *Figura 2*. Aunque los más destacados en la producción de *Paulownia* son el cultivo de nudos o meristemos (terminales, axilares y adventicios) y la embriogénesis tanto directa como indirecta (George, Hall and Klerk, 2008).

El protocolo más utilizado para la micropropagación, de forma general, y en concreto de *Paulownia* es mediante el uso de nudos y brotes adventicios. Se trata de un proceso muy sencillo y habitual en la micropropagación In Vitro de material vegetal puesto que permite la realización de subcultivos de forma sencilla y además de la regeneración del tejido vegetal de forma rápida (Yadav *et al.*, 2013). Estos protocolos a partir de nudos están descritos para la mayoría de especies de este género. La micropropagación mediante embriogénesis indirecta, dicho de otra manera, a partir de tejido indiferenciado o callo presenta varias desventajas si nuestro objetivo es la propagación clonal de la especie puesto que durante esa indiferenciación del tejido meristemático pueden producirse alteraciones genéticas no deseadas en las células embriogénicas que darán lugar a plantas con características no deseadas.

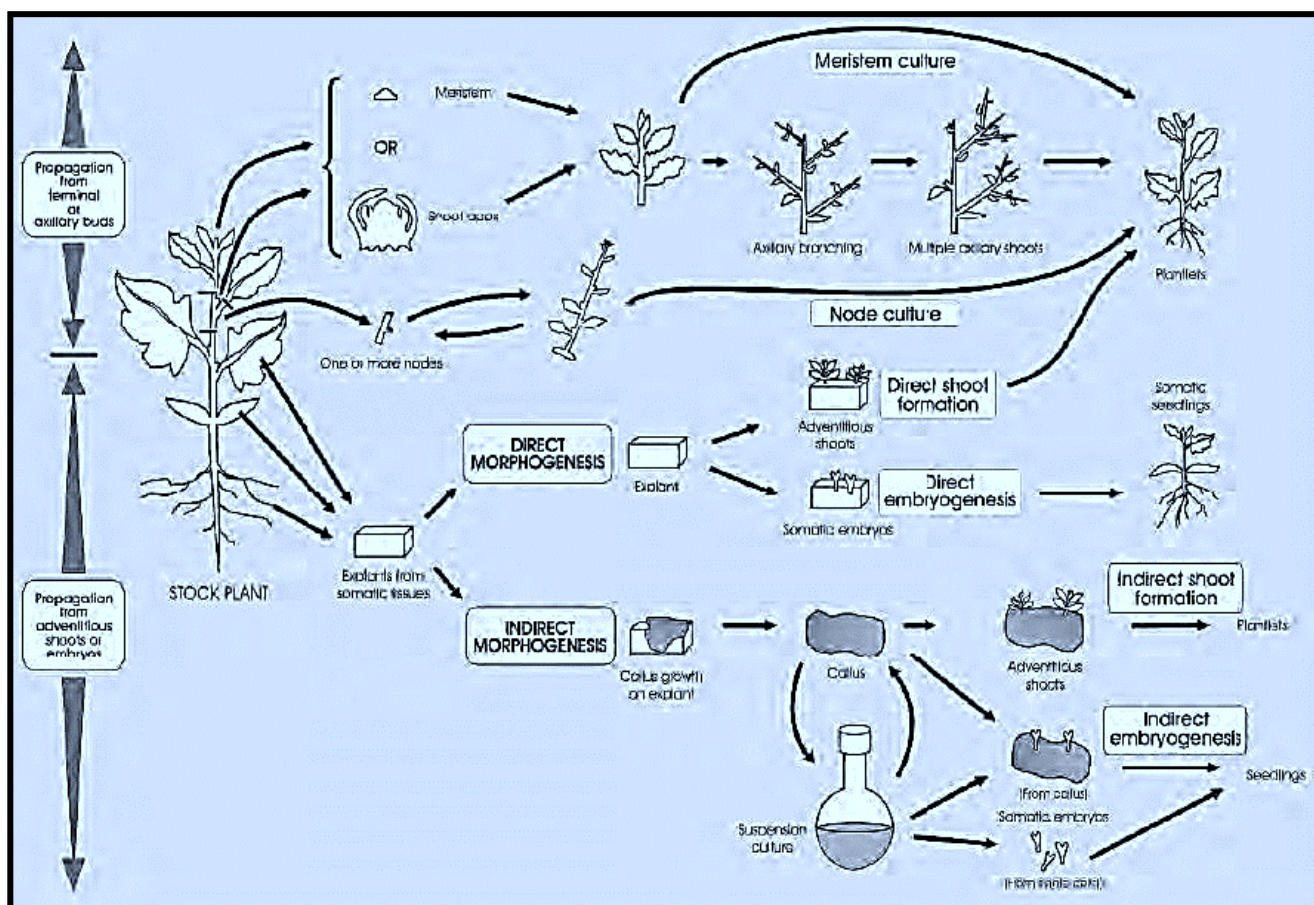


Figura 2: Principales métodos de micropropagación

La micropropagación a partir de brotes adventicios fue descrita en otras especies de *Paulownia* ya en 1982 para *P. elongata* (Ni and Sinica, 1982) y otras como *P. fortunei* en 1993 (Goh, 1993). No fue hasta 1996 cuando se describió en *P. tomentosa* este método de micropropagación (Bergmann and Moon, 1997) y siempre utilizando material vegetal procedente de individuos juveniles (menos de 15 años). En 2008 se consiguió establecer un protocolo a partir de brotes adventicios en explantes de hojas maduras de *P. tomentosa* (Corredoira, Ballester and Vieitez, 2008).

El primer protocolo para la micropropagación de forma masiva y eficiente de *P. tomentosa* a partir de nudos en plantas adultas fue descrito en 1989, más concretamente de las yemas axilares (Burger, 1989). Este protocolo está descrito de forma muy parecida para *P. elongata* 12 años más tarde (Ipekci and Gozukirmizi, 2003). Una intensidad lumínica óptima de **1900 lux** afectaba de forma positiva a los cultivos de meristemos de *Paulownia tomentosa* aumentando tanto altura como número de hojas de los brotes (Chunchukov and Yancheva, 2015).



1.5 Reguladores del crecimiento *In vitro*

Los reguladores del crecimiento más utilizados en el cultivo *in vitro* de plantas son las Auxinas y Citoquininas. Se trata de los dos grupos principales de hormonas vegetales que además suelen aplicarse de forma conjunta aunque en concentraciones variables. Además de estas dos existen una amplia gama de reguladores tanto naturales como artificiales que son de uso más concreto y no suelen aplicarse en todos los cultivos *in vitro* como por ejemplo giberelinas, ácido abscísico, etc. (Walker and Ditor, 2009). Es por ello que nos centraremos en Auxinas y más concretamente en las Citoquininas tanto naturales como artificiales que en algunos casos igualan o superan la efectividad de estos reguladores naturales.

Las Auxinas son unos reguladores ampliamente utilizados en el cultivo de tejidos de plantas y normalmente son una parte integral de los nutrientes del medio de cultivo. Las auxinas promueven, normalmente en combinación con citoquininas, el crecimiento del tejido indiferenciado (callo), de los cultivos celulares en suspensión y de órganos. También regulan la dirección de la morfogénesis.

El término auxina tiene origen Griego: *auxein* que significa aumentar el crecimiento. A nivel celular las auxinas controlan los procesos básicos tales como la división y elongación celular. En los tejidos organizados, forman parte del establecimiento y mantenimiento de la polaridad y su efecto más destacado es la dominancia apical. De igual forma también estimulan el foto y gravitropismo, la síntesis de etileno, estimula también la rizogénesis lateral y adventicia inhibiendo la raíz principal y estimula la floración y fructificación. (George, Hall and Klerk, 2008).

Las auxinas más comunes en el cultivo *in vitro* son el Ácido Indol-3-Acético (IAA), que se encuentra de forma natural en las plantas, el Ácido Indol-3-Butírico (IBA) y el ácido 1-naftalenacético (NAA). En relación al cultivo de Paulownia la auxina más ampliamente utilizada es IAA.



La adición al medio de IAA, junto con otros micro y macronutrientes, en el cultivo de embriones zigóticos de *P. tomentosa* produce el desarrollo del callo embriogénico (tejido indiferenciado) mientras que, en contraposición, la adición al medio de NAA produce el desarrollo de callo no embriogénico siempre en combinación con citoquininas (Radojević, 1979). La inducción de callo ha sido optimizada para unas 5 especies de *Paulownia* mediante la adición, de igual manera, de NAA (entre ellas *P. tomentosa*) usando explantes de hoja (Guo-qiang *et al.*, 2001).

Para el estadio de elongación y enraizamiento se ha comprobado que en general *Paulownia* desarrolla raíces en los microcortes de forma natural sin adición de auxinas. (Yadav *et al.*, 2013) aunque en algunas especies es necesario la adición de auxinas (IAA presenta mayor porcentaje de éxito) para potenciar el enraizamiento (Taha, Ibrahim and Farahat, 2008). Cabe destacar que la respuesta de los cultivos a las diferentes concentraciones de esta hormona en el medio sugiere una fuerte relación medio-genotipo.

Las Citoquininas comprenden una clase aparte de hormonas y reguladores del crecimiento. Producen varios efectos cuando se aplican a plantas intactas; particularmente estimulan la síntesis de proteínas y participan en el control del ciclo celular. Es por ello que pueden promover la maduración de los cloroplastos y retrasar la senescencia de partes extirpadas de la planta. Estos efectos son más llamativos en cultivos *in vitro* donde suelen usarse normalmente, como ya se ha mencionado, en combinación con auxinas para estimular la división celular y controlar la morfogénesis, promueven la dominancia apical y estimulan la brotación de las yemas laterales (George, Hall and Klerk, 2008). También destaca su papel como inhibidoras de la síntesis de etileno y en conjunto con las auxinas puede tener un papel sinérgico o antagonista en función del proceso metabólico implicado. En la *figura 3* se pueden observar las principales citoquininas utilizadas en el cultivo *in vitro*.

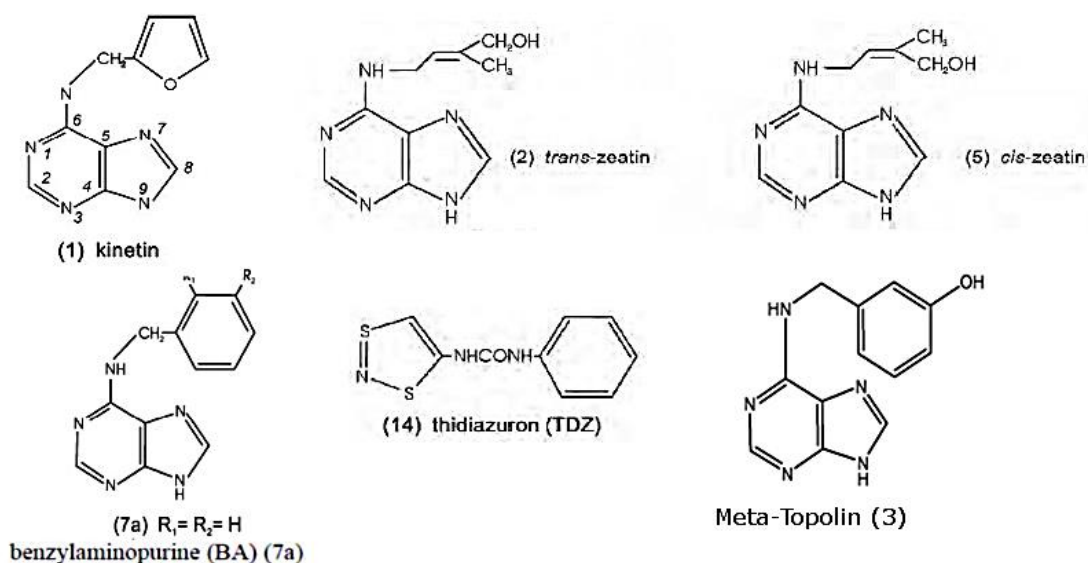


Figura 3: Principales citoquininas utilizadas en cultivo *in vitro*

Algunas de estas hormonas son sintetizadas de forma natural principalmente en los ápices de las raíces aunque las pequeñas cantidades formadas por los brotes en los tejidos *in vitro* es suficiente para mantener estos cultivos. Es por ello que se debe añadir al medio de forma artificial en la mayoría de cultivos si se quieren regenerar o propagar esos cultivos (George, Hall and Klerk, 2008).

La primera citoquinina aislada fue la Kinetina y aunque no se ha conseguido aislar de forma natural, se cree que surge de reordenamientos estructurales durante los procesos de aislamiento ya que muchas citoquininas naturales que estructuralmente están relacionadas a ella se han conseguido identificar (Entsch *et al.*, 1980). Otras citoquininas de estructura similar a Kinetina sí que se han conseguido aislar de forma natural. Muchas de ellas se usan en cultivos vegetales, las más destacadas son Zeatina e Isopenteniladenina o iP (George, Hall and Klerk, 2008).



A pesar de que se continúa usando en ciertas investigaciones, Zeatina y otras citoquininas naturales, no son utilizadas por los laboratorios comerciales de forma rutinaria debido a su elevado precio de venta. En la actualidad existen varios análogos químicos de estos reguladores que poseen una alta actividad en plantas destacando su papel como promotores de la morfogénesis. Las citoquininas sintéticas más comunes en micropropagación, aparte de la Kinetina, son la Bencilaminopurina (BAP) y sus derivados como la Meta-Topolina.

La Meta-topolina es uno de los derivados aromáticos de BAP que posee mayores actividades como citoquinina. Es la citoquinina de uso en investigación menos estudiada así como sus efectos aunque en ensayos con Lirio ha demostrado metabolizarse antes que BAP durante la aclimatación. En cuanto al desarrollo de raíces y enraizamiento *ex vitro* demostró una buena producción de brotes junto con un gran enraizamiento (Werbrouck *et al.*, 1996). En pruebas con Aloe, ha demostrado tener una mayor tasa de multiplicación y enraizamiento a 5mM en comparación con BAP o Zeatina y además con un gran éxito en la aclimatación (Bairu *et al.*, 2007).

Cabe destacar el caso del Tidiazurón o TDZ que, a diferencia de los antes mencionados, no es un compuesto derivado de la adenina, sino que pertenece a la familia de las fenilureas. Este compuesto, en principio registrado como defoliante para algodón ha demostrado tener alta actividad como citoquinina (Mok *et al.*, 1982). En Paulownia, puede resultar más efectivo que los derivados de adenina para inducir la regeneración de brotes adventicios tanto de forma directa como indirecta (Ipekci and Gozukirmizi, 2003; Corredoira, Ballester and Vieitez, 2008) y también se ha demostrado que puede ser muy eficaz para la inducción de brotes axilares. A pesar de ello, la masiva generación de brotes provoca que no puedan alcanzar longitudes elevadas (George, Hall and Klerk, 2008).

1.6 BAP

Se trata de la hormona reguladora del crecimiento más ampliamente utilizada en los cultivos *in vitro* de todas las especies de Paulownia, incluyendo a sus respectivos híbridos, con un éxito considerable (Yadav *et al.*, 2013). Sin embargo en especies concretas puede sufrir variaciones en su efectividad como se ha mencionado anteriormente.



Este regulador del crecimiento ha sido testado en *Paulownia* con éxito para la inducción de cultivos embriogénicos y la regeneración de plantas. También se ha utilizado para inducir embriogénesis somática tanto directa como indirecta desde explantes de hojas y nudos (Yadav *et al.*, 2013). Para micropropagación se han establecido diferentes protocolos a partir de brotes axilares con BAP (Taha, Ibrahim and Farahat, 2008; Olmedo, 2017). En cuanto al enraizamiento *in vitro* también ha sido establecido con éxito en *Paulownia* con adición de auxinas y en su ausencia con buenos resultados (Ipekci and Gozukirmizi, 2003).

En este trabajo, se utilizará BAP para la modulación de nódulos meristemáticos dado el gran conocimiento del que se dispone sobre sus efectos en el cultivo *in vitro*, la efectividad que presenta en cultivos de *Paulownia*, su disponibilidad en el mercado y su asequibilidad.

2. ANTECEDENTES Y MOTIVACIONES

El origen de esta investigación radica en los artículos publicados por la Dra. Elena Corredoira y su equipo de investigación en relación a la regeneración y micropropagación de *Paulownia tomentosa* a partir de la inducción de yemas adventicias en explantes de hojas y su posterior estudio del proceso caulogénico (Corredoira, Ballester and Vieitez, 2008; Corredoira, Cernadas and San José, 2010). Al observar el protocolo de micropropagación planteado nos preguntamos si habría algún método de micropropagación de *Paulownia tomentosa* que consiguiera generar una mayor cantidad de material vegetal (explantes de tallos en nuestro caso) en el menor tiempo posible en relación a los métodos de micropropagación que se aplican en la actualidad a partir de brotación axilar o adventicia.



En la actualidad la mayor parte producción comercial de *Paulownia* se realiza mediante micropropagación por cultivo de tejidos *in vitro*. Esta metodología biotecnológica es susceptible de ser mejorada en dos de sus fases más importantes como son la de multiplicación y la aclimatación. En este trabajo nos centraremos en intentar mejorar la fase de multiplicación mediante la modulación de masas de nódulos meristemáticos para, en el futuro, intentar la transferencia de la metodología empleada a cultivo en medio líquido para su producción a gran escala en biorreactores.

El cultivo *in vitro* en biorreactores representa todo un reto en la micropropagación y obtención de biomasa vegetal así como de compuestos de interés industrial o comercial, a partir de esa biomasa, puesto que la tecnología empleada es más costosa y necesita de más especialización que la empleada, por ejemplo, en el cultivo microbiológico. Este tipo de técnicas de cultivo se están extendiendo cada vez más para el cultivo de ciertas plantas superiores para fines comerciales y presenta grandes oportunidades de cara al futuro. Cabe destacar algunas investigaciones llevadas recientemente a cabo en micropropagación de Margarita africana en tanques de inmersión temporal con muy buenos resultados (Mosqueda Frómata *et al.*, 2017) o las realizadas en Rosa japonesa para la obtención de biomasa y diferentes compuestos bioactivos mediante sistemas de cultivo en diferentes tipos de biorreactores de inmersión continua y temporal (Jang *et al.*, 2016).

3. OBJETIVOS

Considerando los antecedentes expuestos anteriormente, los objetivos de este trabajo son:

- La búsqueda de un método rápido, eficiente y sencillo para la obtención de biomasa de *Paulownia tomentosa* tanto para investigaciones como para futuras aplicaciones industriales en medios convencionales y su adaptación a biorreactores en medio líquido.

- La elección de la concentración adecuada de BAP para la correcta modulación de las masas de tallos de los nódulos meristemáticos.

- Como consecuencia de ello, también estudiaremos el proceso morfogénico producido en las masas de nódulos meristemáticos al someterlos a diferentes concentraciones de BAP.



4. MATERIALES Y MÉTODOS

Dados los objetivos de esta investigación, nos centraremos en los 3 primeros estadios de la micropropagación sin llegar a indagar en la aclimatación a condiciones *ex vitro*.

4.1 Obtención del material vegetal

Los cultivos de tallos micropropagados de *Paulownia tomentosa* que constituyen el material vegetal utilizado en este trabajo fueron iniciados a partir de semillas (cedidas por la Dra. M^a del Carmen San José del Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC). Las semillas fueron separadas de los frutos y desinfectadas por inmersión en una solución de lejía al 20 % durante 15 minutos con un lavado intermedio (5 minutos) en agua ultra pura estéril, un segundo lavado de 30 segundos en etanol al 70% y seis lavados adicionales de 5 minutos en agua ultra pura estéril. Después del tratamiento de desinfección todas las manipulaciones se realizaron en condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar.

Las semillas desinfectadas fueron sembradas en tubos de cultivo Kim kap de 2 cm. de diámetro que contenían 10 ml de medio para germinación de semillas MS completo (Murashige and Skoog, 1962) a ½ de concentración solidificado con 7 gr/L de agar sin sacarosa y un pH de 5,75. Los tubos se transfirieron a la cámara de cultivo de tejidos *in vitro* a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en oscuridad durante dos semanas hasta que tuvo lugar la germinación de las semillas, en ese momento las plántulas fueron expuestas a condiciones de iluminación (con luz blanca fluorescente con una densidad de flujo radiante de $30\mu\text{mol/m}^2.\text{s}$) y un fotoperiodo de 16 horas y a la misma temperatura.

4.2 Multiplicación y obtención de masas de nódulos meristemáticos

Cuando las plántulas alcanzaron una longitud media de 6 cm., con aproximadamente 4 entrenudos por plántula, se procedió a su disección para comenzar la fase de multiplicación. Los entrenudos (explantos) fueron transferidos a medio de multiplicación MS (Murashige and Skoog, 1962) modificado con la incorporación de 0,5 mg/L de BAP y 80mg/l de Floroglucinol.



En esta etapa los cultivos se realizaron en contenedores desechables ECO2 (DUCHEFA) con membrana para intercambio gaseoso en la tapa del contendor, fabricados con polipropileno transparente y con una altura de 8 cm. En cada contenedor se dispensó un volumen de 100 ml de medio y se inocularon 12 entrenudos. Los cultivos fueron multiplicados mediante subcultivo de entrenudos a intervalos de cuatro semanas.

Tras 22 meses, se aislaron los entrenudos resultantes en placas Petri de cultivo de 90 mm de diámetro a las que se transfirieron entre 8 y 10 entrenudos por placa para comenzar la fase de obtención de las masas de nódulos meristemáticos o clústers. El medio utilizado fue MS (Murashige and Skoog, 1962) modificado con la incorporación de 10 mg/L de Tidiazurón (TDZ) y 80mg/L de Floroglucinol. En cada placa se dispensó un volumen de 60 mL. Estos cultivos fueron mantenidos mediante la disgregación de las masas de nódulos meristemáticos en intervalos de 5 a 6 semanas.



Figura 4: Masas de nódulos meristemáticos en cultivo.



4.3 Modulación de las masas de nódulos meristemáticos

Pasados 7 meses, y tras 4 subcultivos de estos clústers, se consideró que estaban en el momento óptimo para realizar la modulación dado el poco tejido indiferenciado que habían desarrollado hasta ese momento como puede apreciarse en la Figura 4 y la aparente homogeneidad que presentaban todas las repeticiones.

Llegados a este punto se preparó el medio de modulación de las masas de nódulos meristemáticos o PTSCR (Paulownia Tomentosa Shoot Cluster Regulation). Este medio de cultivo estaba compuesto por medio MS (Murashige and Skoog, 1962) completo (4.42gr/L) al que se le añadieron 30 gr. de Sacarosa, 25 mg. de Secuestrene (SEQ), 50 mg. de Floroglucinol y un pH de 5,75.

A continuación se añadió la fitohormona, BAP, en 5 concentraciones distintas; 0, 0.5, 1, 2 y 4 mg/L en función del tratamiento. Cada tratamiento se componía de 4 repeticiones de frascos desechables estériles de cultivo de 250 ml con 50 ml. de medio cada uno y en cada frasco se sembró 1 clúster. Se obtuvo un total de 20 frascos estériles de cultivo con medio PTSCR que podemos observar en la figura 5. Estos frascos se incubaron en cámara de cultivo a una temperatura de 25°C y 16 horas de luz.

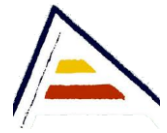
4.4 Análisis de los resultados

La evaluación de los distintos medios de modulación o PTSCR de las masas de nódulos meristemáticos se realizó a partir de 4 parámetros. La longitud media de los tallos, la biomasa media de los clústers, la tasa de multiplicación media de los tallos reactivos y el número medio de hojas por tallo reactivo. Para los dos últimos parámetros se tuvieron en cuenta tan solo aquellos tallos que alcanzaban o superaban los 12 mm de longitud ya que aquellos que presentaban un menor crecimiento se desecharon por problemas de viabilidad.



Para la toma de medidas de longitud de los tallos a lo largo de las primeras 5 semanas de duración del experimento se utilizó el software de análisis de imágenes ImageJ, puesto que se utilizó un método de medida no invasivo, dado el bajo número de repeticiones disponibles y el alto grado de esterilidad del material vegetal. Para la semana 6, puesto que era la última semana, las medidas se tomaron de forma directa.

Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS. Los datos fueron tratados con el test de *Levene* de homogeneidad de varianzas y posteriormente se estimaron las diferencias entre las medias, para un nivel de significación del 95% ($p=0.05$), mediante el test de la diferencia mínima significativa (DSM).



5. CRONOGRAMA

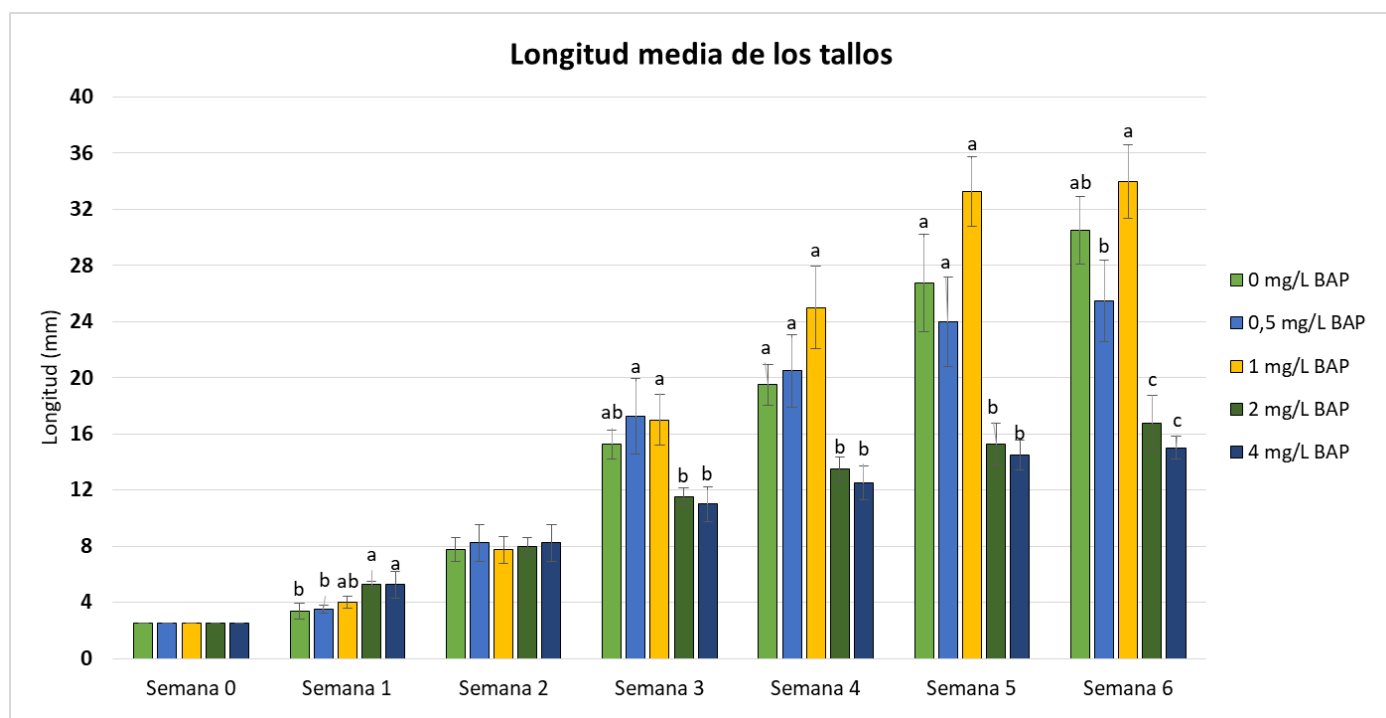
Años		2015				2016	2017		2018		
Etapas	Meses	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero - Diciembre	Enero - Agosto	Septiembre - Diciembre	Enero - marzo	Abril	Mayo
Germinación de las semillas											
Crecimiento											
Multiplicación											
Obtención de las masas de nódulos meristemáticos											
Modulación de las masas de nódulos meristemáticos											



6. RESULTADOS

Los resultados que aquí se reflejan son el resultado de 6 semanas de modulación de las masas de nódulos meristemáticos en el medio PTSCR. Los parámetros elegidos para evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de BAP sobre los clústers han sido la longitud media de los tallos, la biomasa media de los clústers, la tasa de multiplicación media de los tallos reactivos y el número medio de hojas por tallo reactivo. Cuando nos referimos a tallos reactivos, hacemos referencia a aquellos que han alcanzado, al menos, los 12 mm de longitud.

El desarrollo de los clústers a lo largo de estas 6 semanas se evaluó principalmente a partir de la longitud media que presentaban los tallos desarrollados de cada uno de los tratamientos. La diferenciación producida durante cada semana así como las diferencias significativas entre los tratamientos se pueden observar en la Gráfica 1.



Gráfica 1: Longitud media de los tallos a lo largo del experimento

*Los valores medios (barras) que presentan la misma letra no difieren significativamente entre ellos

En la semana 0 todas las repeticiones presentaban la misma longitud puesto que antes de su siembra todas las masas de nódulos meristemáticos fueron homogeneizadas para que los brotes tuvieran todos una altura media aproximada de 2.5 mm.



Durante la semana 1 comenzaron a verse las primeras diferenciaciones aunque de manera muy leve y por lo general presentando mayor elongación a más concentración de BAP. Las concentraciones de 2 y 4 mg/L presentaron en general una mayor diferenciación en comparación con el resto de tratamientos en los que tan solo se observaban elongaciones parciales en algunas de las repeticiones que podemos observar en la *Figura 5*.

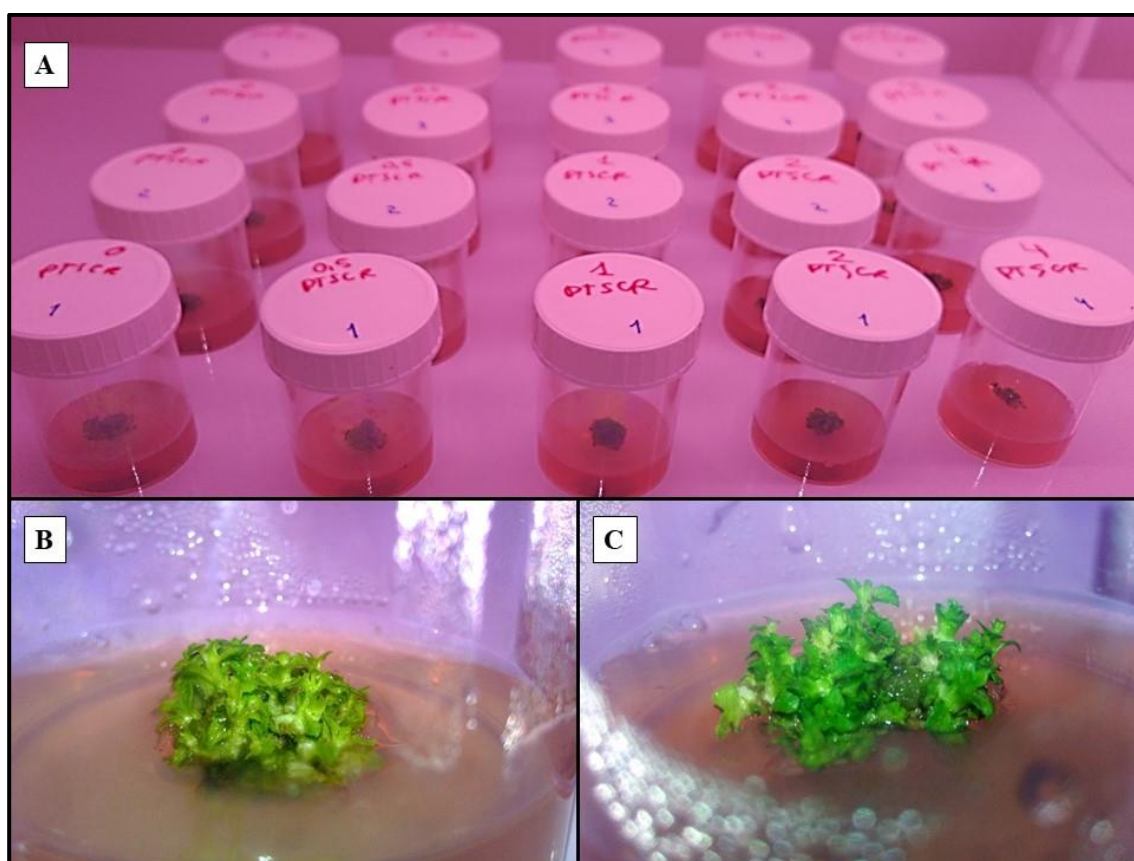


Figura 5. A. Frascos en la cámara de cultivo en la semana 0 de la modulación. B. Clúster del tratamiento de 0.5 mg/L en la semana 0. C. Clúster del tratamiento de 2 mg/L en la semana 1.

La semana 2 destacó por un crecimiento homogéneo en el que no se produjeron diferencias significativas entre los tratamientos con diferenciaciones de tallos claras en la mayoría de repeticiones hasta alcanzar una altura media en general de unos 8 mm. Algunos de los clústers también comenzaron a desarrollar tallos por la parte inferior quedando inmersos en el medio de cultivo. Cabe destacar que se comenzó a observar una ligera proliferación de tejido indiferenciado (callo) en ciertas repeticiones.



En la semana 3 comenzó a observarse una tendencia más clara en función de los tratamientos viéndose ya diferencias muy significativas entre las concentraciones 0, 0.5 y 1 mg/L respecto a las concentraciones 2 y 4 mg/L. Las primeras destacaron por presentar un gran elongamiento y diferenciación de sus tallos en general mientras que en las últimas el crecimiento volvió a ser más lento con un desarrollo del tejido indiferenciado mucho mayor al que presentaban las concentraciones 0, 0.5 y 1 mg/L como se observa claramente en la *Figura 6*.

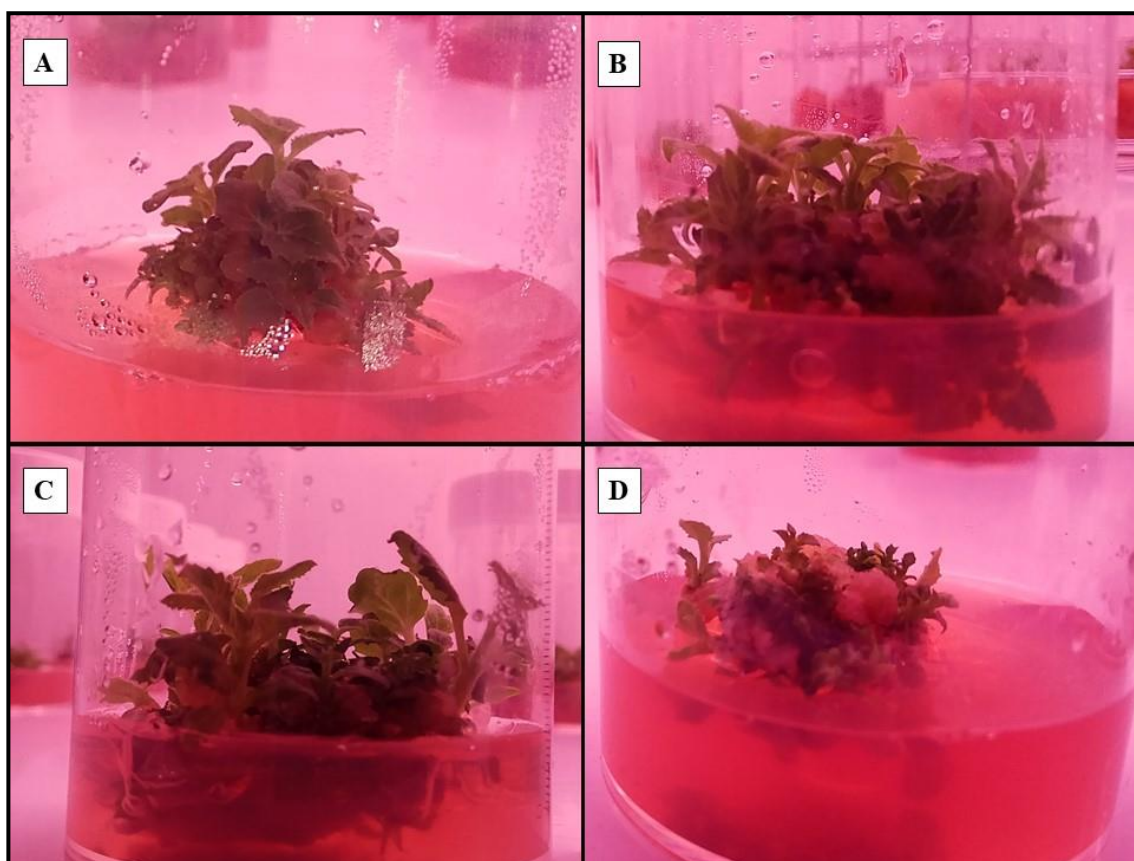


Figura 6. A. Clúster del tratamiento de 0 mg/L en la semana 3. B. Clúster del tratamiento de 0.5 mg/L en la semana 3. C. Clúster del tratamiento de 1 mg/L en la semana 1. D. Clúster del tratamiento de 2 mg/L en la semana 3

Durante la semana 4 continuó acentuándose la tendencia descrita en la semana anterior destacando definitivamente la longitud de los tallos de las concentraciones 0, 0.5 y 1 mg/L. Esta última concentración destacó también entre ellas mostrando los valores de longitud media más altos pero sin tener diferencias significativas con los otros dos tratamientos. Destacamos las grandes hojas que comenzaron a desarrollar algunos de los tallos de estos tratamientos.



Los otros dos tratamientos (2 y 4 mg/L) apenas presentaron diferencias respecto a la semana anterior tanto en longitud como en diferenciación de tallos. La proliferación de callo afectó a todas las concentraciones aunque en los tratamientos de 2 y 4 mg/L el crecimiento de este tejido indiferenciado fue mucho mayor.

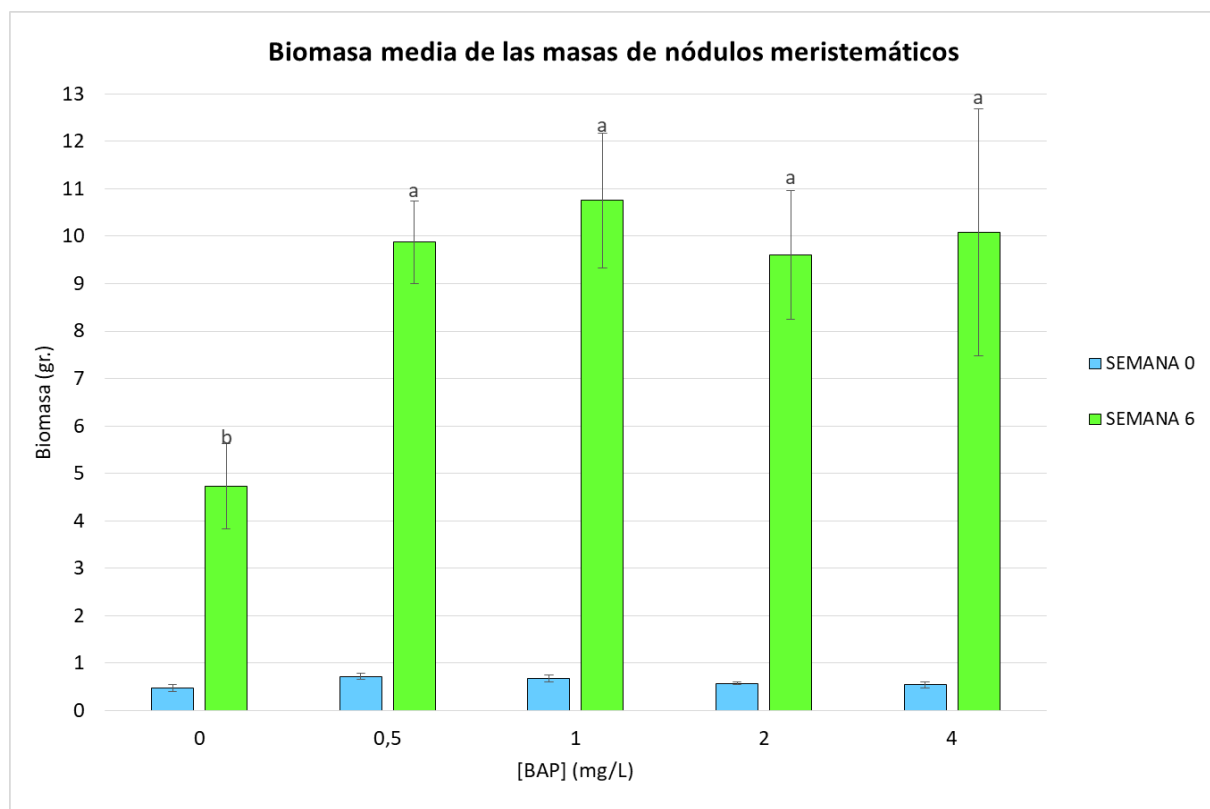
En las semanas 5 y 6 se produjo una estabilización generalizada del proceso morfogénico en los clústers puesto que tanto el crecimiento como la proliferación y diferenciación de los tallos apenas sufrió variaciones en este periodo. El tratamiento de 1 mg/L terminó destacando sobre los demás, con una media de casi 35 mm. de longitud, presentando diferencias significativas con todos los demás a excepción de la concentración de 0 mg/L pero sin embargo con diferencias claras en vigorosidad. El tratamiento de 0.5 mg/L comenzó a presentar una mayor heterogeneidad entre sus repeticiones a causa de la proliferación de callo mientras que en 1 mg/L y 0 mg/L la homogeneidad era mayor. Los otros tratamientos (2 y 4 mg/L) no presentaron diferencias entre ellos y la cantidad de tejido indiferenciado continuó aumentando aunque durante la semana 6 de manera mucho más lenta. Estas diferencias pueden observarse claramente en la *Figura 7*.



Figura 7. A. Tratamiento de 1 mg/L durante la semana 6. B. Tratamiento de 4 mg/L durante la semana 6.



La biomasa media de los clústers fue medida al comienzo de la modulación y tras finalizar el periodo de 6 semanas. Se buscaba observar si la biomasa inicial resultaba determinante en el proceso de modulación respecto a su biomasa final en los diferentes tratamientos. Los datos obtenidos sobre la biomasa media de los clústers al inicio y final de la modulación se pueden observar en la *Gráfica 2*.



Gráfica 2: Biomasa media de los clústers en función de su tratamiento

**Los valores medios (barras) que presentan la misma letra no difieren significativamente entre ellos*

Las biomاسas medias iniciales de las masas de nódulos meristemáticos, a pesar de presentar ligeras variaciones, no presentaban diferencias significativas entre ellas mientras que las biomاسas medias al final de la etapa de modulación variaban en mayor proporción, como se puede comprobar en la *Figura 8*, aunque tan solo se presentaban diferencias significativas entre el tratamiento de 0 mg/L y los 4 tratamientos restantes. Entre estos últimos no se aprecian diferencias significativas, en gran parte debido al gran error estándar que presentan, siendo la media mayor en 1 mg/L (10.75 gr.).

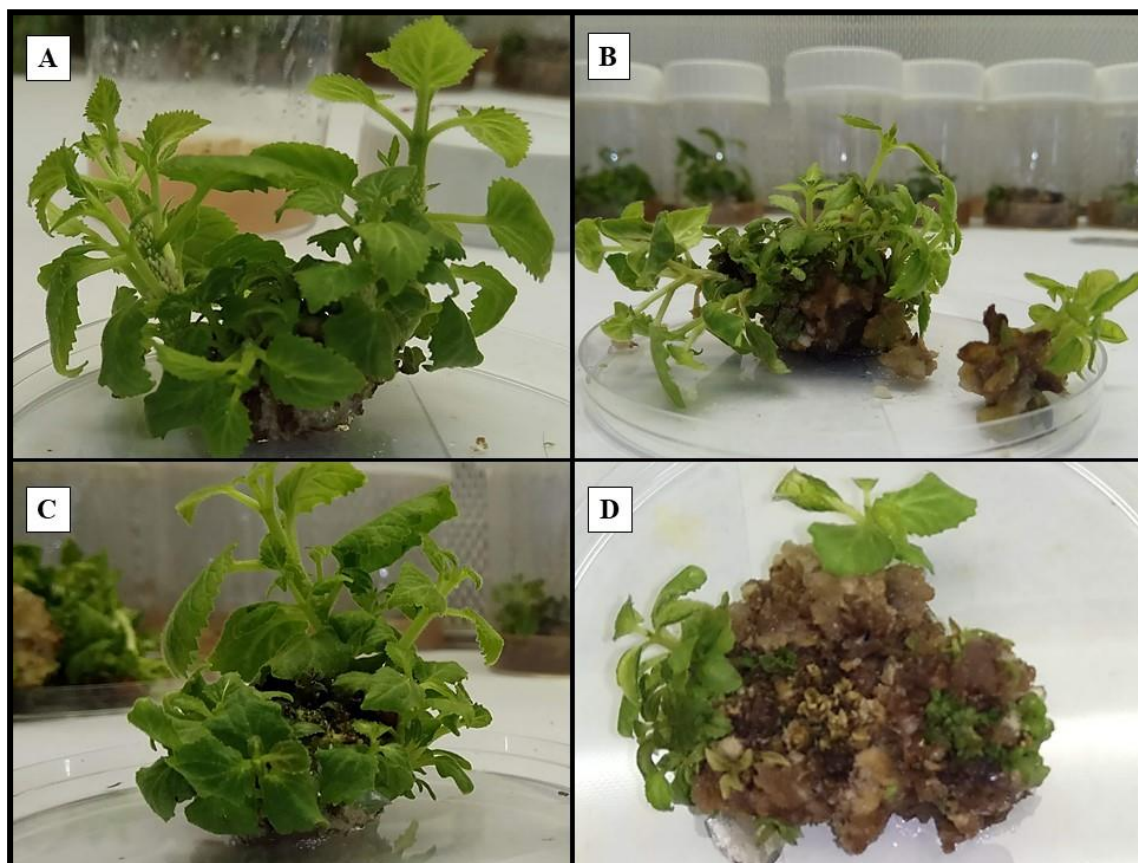
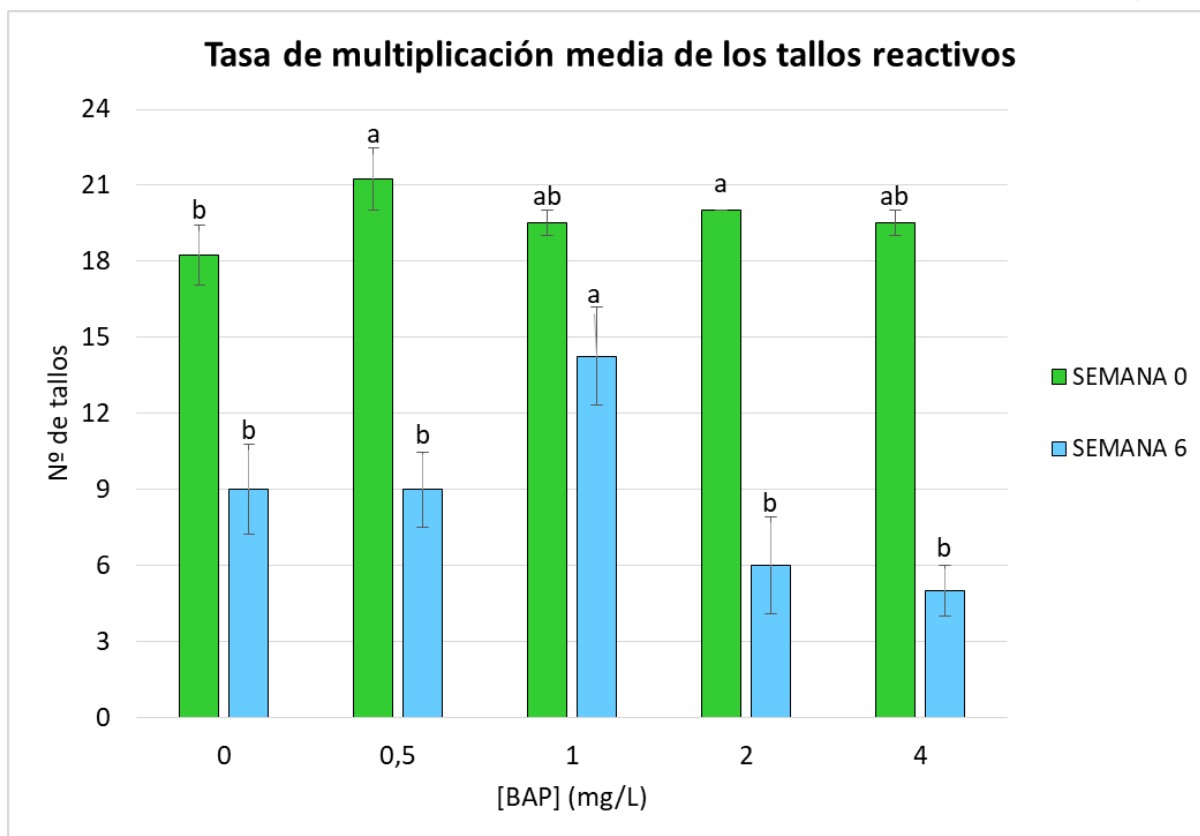


Figura 8. A. Clúster del tratamiento de 0 mg/L al final de la modulación. B. Clúster del tratamiento de 0.5 mg/L al final de la modulación. C. Clúster del tratamiento de 1 mg/L al final de la modulación. D. Clúster del tratamiento de 2 mg/L al final de la modulación.

La tasa de multiplicación media de los tallos reactivos o número medio de tallos reactivo por tratamiento también fue estimado al comienzo del proceso de modulación de las masas de nódulos meristemáticos y al finalizar las 6 semanas. El objetivo fundamental era comprobar si el número inicial de tallos o nódulos meristemáticos influía en el número de tallos reactivos por clúster al final de la modulación en función del tratamiento.

Los datos obtenidos del cálculo del número medio de tallos al comienzo y al final de la modulación en función del tratamiento se pueden comprobar en la *Gráfica 3*.



Gráfica 3: Número medio de tallos por tratamiento

**Los valores medios (barras) que presentan la misma letra no difieren significativamente entre ellos*

El número medio de nódulos meristemáticos al comienzo de la etapa de modulación presentaba diferencias significativas entre algunos de los tratamientos, exactamente entre los tratamientos de 2 y 0.5 mg/L (20 y 21.25 tallos respectivamente) en comparación con el tratamiento de 0 mg/L (18.25 tallos).

Por otra parte, el número medio de tallos reactivos al final de la etapa de modulación presentan tan solo una diferencia significativa en el tratamiento de 1 mg/L (14.25 tallos) respecto a los 4 tratamientos restantes donde destacan los tratamientos 0 y 0.5 mg/L con una media de 9 tallos en ambos en comparación con los tratamientos 2 y 4 mg/L donde apenas se alcanza una media de 6 y 5 tallos respectivamente pero sin presentar diferencias significativas entre los 4 dado el alto error estándar que presentan estas medias. Esta diferencia en el número de tallos entre los tratamientos puede apreciarse en la *Figura 9*.

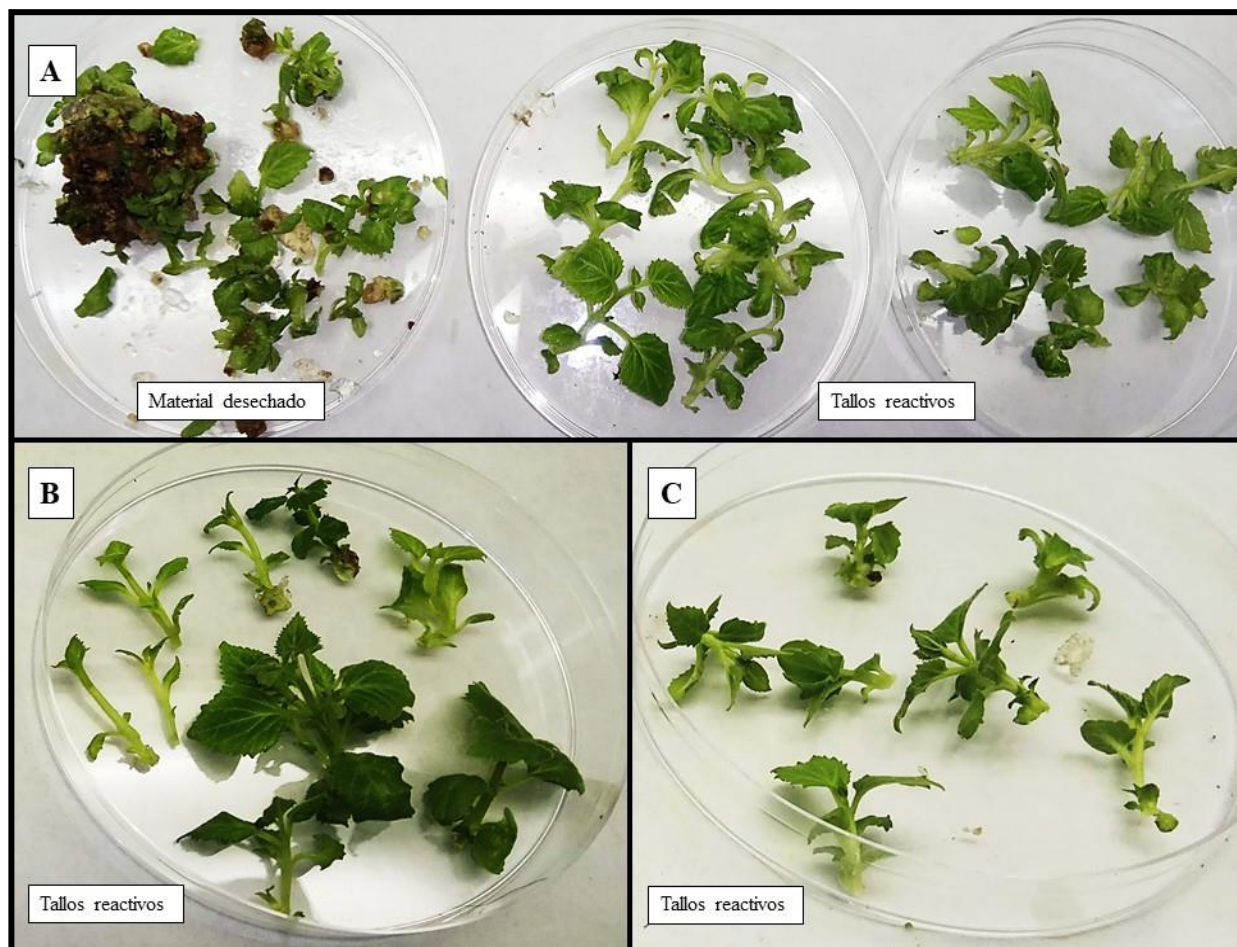
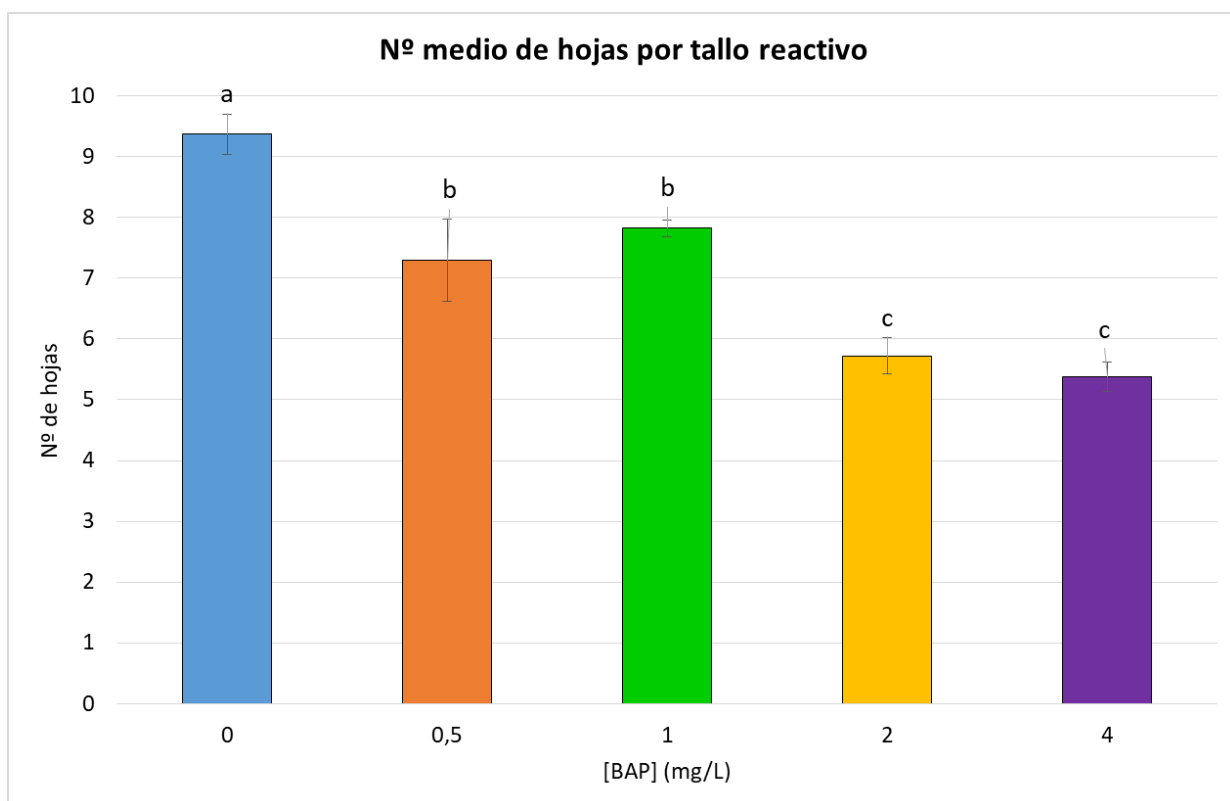


Figura 9. A. Material vegetal correspondiente a una repetición del tratamiento de 1 mg/L al final de la modulación donde se diferencia a la izquierda el material desechado y a la derecha las dos placas Petri con los tallos reactivos. B. Tallos reactivos correspondientes a una repetición del tratamiento de 0 mg/L al final de la modulación. C. Tallos reactivos correspondientes a una repetición del tratamiento de 2 mg/L al final de la modulación.

El número medio de hojas por tallo reactivo se calculó al final de la etapa de modulación. Comparamos el número medio de hojas por tallo reactivo de todas las repeticiones en función del tratamiento al cual estaban siendo sometidas las masas de nódulos meristemáticos. Los resultados obtenidos se pueden observar en la *Gráfica 4*.



Gráfica 4: Número medio de hojas en función del tratamiento

*Los valores medios (barras) que presentan la misma letra no difieren significativamente entre ellos

El número medio de hojas presentó diferencias significativas entre los tratamientos empleados a pesar de que no hubo grandes variaciones en cuanto a cantidad y los errores que presentan las medias no eran demasiado elevados. El tratamiento control (0 mg/L) destacó por encima de los otros con una media de hojas por tallo reactivo de 9.4. Este resultado presentaba diferencias significativas con todos los demás tratamientos. El valor más aproximado fue 7.8 hojas del tratamiento de 1 mg/L el cual presentaba diferencias también con el resto a excepción del tratamiento de 0.5 mg/L. Los dos tratamientos restantes (2 y 4 mg/L) no presentaban diferencias entre ellos aunque sí con el resto de tratamientos presentando los valores medios más pequeños de todos los tratamientos.



7. DISCUSIÓN

7.1 Longitud media de los tallos

Como se ha podido observar en el apartado de resultados, la longitud media más elevada al final de la etapa de modulación fue la de aquellas masas de nódulos meristemáticos a las que se les aplicó el tratamiento correspondiente a 1 mg/L de BAP el cual se ha comprobado en otras investigaciones con *Paulownia tomentosa* que es la concentración óptima para la inducción de tallos a partir de segmentos nodales (Bahri and Bettaieb, 2013). Este tratamiento obtuvo una media de longitud superior a los 34 mm pero con un error relativamente alto que provocó que el tratamiento control (0 mg/L) no presentara diferencias significativas respecto a él obteniendo una media de 30 mm aunque de nuevo con un error significativo.

Este hecho puede ser justificado debido al bajo número de repeticiones (4) por tratamiento puesto que ciertas repeticiones dentro del mismo tratamiento distaban de manera significativa provocando, a la hora de realizar las medias, estos errores tan elevados.

Seguidamente de estos dos tratamientos encontramos el tratamiento de 0.5 mg/L que alcanzó una altura media superior a los 25 mm pero de nuevo con un gran error mientras que los dos últimos tratamientos (2 y 4 mg/L) presentaban un error, en proporción, mucho menor a los anteriores con unas medias de longitud no superiores a los 18 mm lo cual también parece indicar que a mayor desarrollo y diferenciación de los tallos, mayor es el error.

Observando el proceso de modulación a lo largo de las 6 semanas se puede afirmar que a partir de la semana 4 el proceso morfogénico que sufren los clústers va estabilizándose de forma gradual hasta que de la semana 5 a la 6 apenas hay variaciones respecto a la longitud.



Si de igual manera prestamos atención por separado a los tratamientos a lo largo de las semanas también se observa una tendencia a una mayor estabilización cuanto mayor es la concentración de BAP, por ejemplo, en el tratamiento control se observa un mayor crecimiento en las últimas 3 semanas respecto a cualquiera de los otros tratamientos mientras que en los tratamientos de 2 y 4 mg/L apenas hay variaciones a partir de la semana 3.

Pero tal como se ha comentado anteriormente, el bajo número de repeticiones puede también estar relacionado con estas hipótesis sesgando nuestra visión de la modulación de los clústers.

Respecto a la generación de tejido indiferenciado (callo) ha habido grandes diferencias en función de los tratamientos e incluso entre repeticiones dentro del mismo tratamiento. En la *Figura 6*, por ejemplo se observan varios clústers durante la semana 3 en los que se puede apreciar que el tratamiento de 2 mg/L (D) presenta una mayor proliferación de tejido indiferenciado en comparación con los demás tratamientos presentes (0, 0.5 y 1 mg/L). Esta tendencia continuó a lo largo de toda la modulación, observándose mayor proliferación de callo en los tratamientos con más concentración de BAP.

Donde mejor podemos observar dicha tendencia es en la *Figura 7* en la que se comparó el tratamiento completo de 1 mg/L con el tratamiento de 4 mg/L. No cabe duda de las grandes diferencias que hay entre ambos tratamientos ya que a simple vista se puede observar la gran proliferación de tejido indiferenciado en todas las repeticiones del tratamiento de 4 mg/L mientras que en el tratamiento de 1 mg/L no se observa presencia de callo en ninguna de las repeticiones además de tener una gran frondosidad de tallos bien desarrollados.

Estas evidencias nos invitan a pensar que la aplicación a los clúster de una concentración de BAP por encima de 1 mg/L no contribuye a la correcta diferenciación de las masas de nódulos meristemáticos sino que por el contrario genera una disminución del proceso morfogénico induciendo la proliferación de tejido indiferenciado que evita el correcto desarrollo de los tallos.



Estos mismos resultados se han observado en estudios con *Paulownia kawakamii* en la formación de brotes a partir de yemas axilares donde al aumentar la concentración de BAP por encima de 1 mg/L generalmente se producía un efecto depresivo en las características morfogénicas anteriores (Taha, Ibrahim and Farahat, 2008).

Los resultados que estamos observando pueden ser explicados dado el importante papel fisiológico de las citoquininas estimulando la división y elongación celular además de muchos otros efectos fisiológicos que comentamos anteriormente. Aunque de manera contraria, el uso de altos niveles de citoquininas es uno de los métodos más efectivos para reducir el número de brotes y promover la formación de tejido indiferenciado (Ziv, 1992).

7.2 Biomasa media de las masas de nódulos meristemáticos

Los datos obtenidos respecto a las biomásas medias de los clúster en la *Gráfica 2* no resultan demasiado reveladores en gran medida a causa del error que presentan las medias de estos datos. Consecuencia de ellos es que tan solo la biomasa media al final de la modulación del tratamiento control (0 mg/L) presente diferencias significativas con el resto.

Respecto a las Biomásas medias iniciales destacamos su aparente homogeneidad puesto que apenas oscilan los valores de los distintos tratamientos y entre ellos se presenta un error muy bajo. A causa de esto las biomásas medias al final de la modulación no deberían estar condicionadas por sus biomásas iniciales ya que no presentan diferencias significativas por lo que los resultados que se han obtenido al finalizar la modulación, en teoría, han estado influidos tan solo por sus respectivos tratamientos.

Al observar la biomasa media final del tratamiento de 4 mg/L vemos como posee una de las mayores medias acompaña del error más abultado de todos los tratamientos. Es curioso puesto que este tratamiento, si miramos la *Gráfica 1*, presentaba los tallos con la menor altura media dado el bajo nivel de diferenciación de los clústers. Una probable causa de ello es la gran proliferación de tejido indiferenciado que se produjo en gran medida en el tratamiento de 2 mg/L y, sobretudo, en el tratamiento de 4 mg/L por el alto nivel de BAP de estos tratamientos (Ziv, 1992) que provocó que las biomásas medias de estos clústers resultaran tan elevadas. En la Figura 8 este hecho se refleja bien al comparar el tratamiento de 2 mg/L (D) con el resto.



Otra de las posibles explicaciones al gran error que presentaban estas biomásas medias es la gran heterogeneidad que presentaban algunas repeticiones dentro del mismo tratamiento. Estas diferencias entre repeticiones se ve muy claramente en la *Figura 7*, donde en el tratamiento de 4 mg/L (B) a simple vista se podían observar claras variaciones morfológicas relacionadas con la mayor o menor proliferación de callo. Para disminuir esta heterogeneidad que presentaba el material vegetal habría que realizar un mayor número de repeticiones por tratamiento.

Si de nuevo nos fijamos en las biomásas medias de la Gráfica 2, a pesar de no presentar diferencias significativas, la biomasa media más alta es la del tratamiento de 1 mg/L que casi alcanza los 11 gr. El error en este tratamiento es de nuevo muy elevado pero resulta revelador que este tratamiento haya sido el que mayor biomasa media ha obtenido puesto que, como se ha comentado anteriormente, también resultó el tratamiento con una mayor longitud media de los tallos según la Gráfica 1. Esta relación podría indicar que a esta concentración (1 mg/L) se establece un equilibrio entre la diferenciación de las masas de nódulos meristemáticos, produciendo esos tallos, y la generación mínima de tejido indiferenciado.

El tratamiento que presentaba una menor biomasa media y además con diferencias significativas era el control (0 mg/L), hecho que resalta la importancia de las citoquininas y en concreto del BAP en el proceso morfogénico de los clústers. Esta diferencia significativa respecto a los demás tratamientos donde sí que se encontraba presente el fitorregulador BAP, pone de manifiesto el papel de esta hormona como estimulante de la división y elongación celular, de la síntesis de proteínas y otros procesos morfogénicos (Edwin et al, 2008) que como hemos observado pueden contribuir a una mayor proliferación y diferenciación de tallos (como el tratamiento de 1 mg/L) o por el contrario a una generación de masa de tejido indiferenciado (como en los tratamientos de 2 y 4 mg/L), alteraciones genéticas y un crecimiento anormal (Bairu *et al.*, 2007) de los clústers.



Por último resaltar la necesidad de un estudio en mayor profundidad sobre las masas de nódulos meristemáticos puesto que existen más factores determinantes de una buena diferenciación de los clústers además de la cantidad de fitorregulador de cada tratamiento o la biomasa que presentan. Estos incluyen sus características genéticas antes de comenzar el proceso de modulación ya que estos clústers estaban siendo sometidos a una concentración muy alta de TDZ (10 mg/L) a lo largo de un gran periodo de tiempo que podría haber alterado ciertas características bioquímicas y fisiológicas de ellos. También como ya hemos mencionado se necesitaría de un número mayor de réplicas por tratamiento.

7.3 Tasa de multiplicación media de los tallos reactivos

El número medio de tallos reactivos por tratamiento ofrece resultados muy reveladores en cuanto a los tratamientos empleados y su efecto en la proliferación de los tallos puesto que este es uno de los factores más determinantes respecto a la micropropagación *in vitro*. Cabe recordar que para los datos ofrecidos en la semana 6 de la *Gráfica 3* tan sólo se tuvieron en cuenta aquellos tallos que alcanzaban los 12 mm de longitud.

Respecto a la posible influencia del número medio inicial estimado de nódulos meristemáticos en los clústers al comienzo de la modulación respecto al número medio de tallos reactivos al final de la modulación, las diferencias significativas comentadas se dieron entre los tratamientos de 0.5 y 2 mg/L respecto al control (0 mg/L) inicialmente mientras que las diferencias significativas al finalizar la modulación tan solo se dieron entre el tratamiento de 1 mg/L con los demás tratamientos restantes. Este resultado *a priori* nos está indicando que las diferencias significativas dadas inicialmente no están afectando a los resultados finales ya que las diferencias observadas se dan en tratamientos distintos.

Como se acaba de comentar, al final de la modulación el tratamiento de 1 mg/L era el único que presentaba diferencias significativas respecto al resto de tratamientos. Esta diferencia es además muy abultada respecto al resto de tratamientos diferenciándose de los siguientes tratamientos más altos (0 y 0.5 mg/L) en más de 5 tallos de diferencia y respecto al más bajo (4 mg/L) en casi 10 tallos de media. No cabe ninguna duda de que el mejor tratamiento en cuanto a la inducción y diferenciación de tallos durante la etapa de modulación de los clústers es 1 mg/L de BAP.



Destacamos también el aparente efecto inhibitorio producido en los tratamientos de 2 y 4 mg/L que presentaban unas medias de tallos reactivos al final de la modulación muy bajas respecto al resto de tratamientos. Este efecto como también se comentó anteriormente es debido al efecto inhibitorio producido por una concentración excesiva de BAP inhibiendo la diferenciación celular y así la formación de tallos a favor de la generación de tejido indiferenciado (Ziv, 1992). Este efecto inhibitorio del que hablamos se ve muy claramente en la *Figura 9*, donde si comparamos el tratamiento de 2 mg/L (C) con los otros dos observamos diferencias en cuanto a número, altura y vigorosidad.

Estos resultados, unidos a los obtenidos del apartado de longitud media de los tallos y biomasa nos indican por el momento que el mejor tratamiento para la correcta modulación de las masas de nódulos meristemáticos es la de 1 mg/L en gran parte por el hecho de que relaciona el gran número de tallos reactivos obtenidos con una longitud superior de los mismos respecto al resto de tratamientos.

7.4 Número medio de hojas por tallo reactivo

Este último parámetro analizado ha resultado poco esclarecedor respecto a la evaluación de los tratamientos en la modulación de las masas de nódulos meristemáticos. Prueba de ello es que a pesar de que los tratamientos presentan diferencias significativas en sus medias de hojas por tallo, las diferencias en el número de hojas no es demasiado grande. El tratamiento con un mayor número de hojas por tallo resultó ser el control (0 mg/L) como ya vimos en la *Gráfica 4*. Pero realmente su número medio de hojas por tallo (9.4) no difiere demasiado respecto al resto de tratamientos (7.8 hojas por tallo en el tratamiento de 1 mg/L). Por ello una diferencia de hojas tan pequeña con un número tan bajo de repeticiones (4) no nos confirma de manera definitiva si los tratamientos han sido determinantes en esta diferencia.

A pesar de lo anterior, sí que se advierte cierta tendencia inhibitoria al menos en los tratamientos más altos como son el de 2 y 4 mg/L (5.8 y 5.3 hojas por tallo respectivamente) continuando con la tendencia que se ha mencionado en los apartados anteriores demostrando el carácter inhibitorio en la diferenciación que producen las altas concentraciones de citoquininas (Ziv, 1992). Estas dos concentraciones además no muestran diferencias significativas entre ellas pero sí con el resto de tratamientos lo cual respaldaría todavía más nuestro planteamiento.



8. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en este trabajo final de grado son las reflejadas a continuación:

1. La concentración más adecuada para una correcta modulación de las masas de nódulos meristemáticos en función de los resultados obtenidos es 1 mg/L de BAP. Se obtienen un mayor número de tallos por clúster y con una mayor longitud respecto al resto de tratamientos empleados.
2. La modulación de las masas de nódulos meristemáticos con concentraciones de BAP superiores a 1 mg/L genera un efecto inhibitorio respecto a la diferenciación de los tallos disminuyendo tanto su número como su longitud y aumentando la biomasa de tejido indiferenciado en los clústers.
3. Este protocolo permite obtener una gran cantidad de tejido vegetal de una manera sencilla y eficiente que puede ser de utilidad tanto en la industria como en futuras investigaciones científicas.
4. A pesar de los prometedores resultados, se debería de realizar un estudio más exhaustivo con un mayor número de repeticiones y un rango más amplio de tratamientos para lograr optimizar este método y disminuir los errores medios mostrados en este estudio.

CONCLUSIONS

The conclusions obtained in this final degree project are as shown below:

1. The most appropriate concentration for a correct modulation of meristematic clusters based on the results obtained is 1 mg/L of BAP. A greater number of stems is obtained per cluster and with a greater length compared to the rest of the treatments used.
2. The modulation of the meristematic clusters with BAP concentrations higher than 1 mg/L generates an inhibitory effect respect to the differentiation of the stems, decreasing both, their number and length and increasing the biomass of undifferentiated tissue in the clusters.



3. This protocol allows to obtain a large amount of plant tissue in a simple and efficient way that can be useful both in the industry and in future scientific research.
4. Despite the promising results, a more exhaustive study should be carried out with a greater number of repetitions and a wider range of treatments to optimize this method and reduce the average errors shown in this study.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Anjaneyulu, C. Shyamkumar, B. and Giri, C. (2004) 'Progress in tissue culture , genetic transformation and applications of biotechnology to trees : an overview', *Albania journal of Medical and Health Sciences*, pp. 115–135. doi: 10.1007/s00468-003-0287-6.
- Bahri, N. Ben and Bettaieb, T. (2013) 'In vitro propagation of a forest tree Paulownia tomentosa (Thunb.) Steud. - A valuable medicinal tree species - ProQuest', *Albanian Journal of Agricultural Sciences*, 12(1), pp. 37–42.
- Bairu, M. W. Stirk, W. Dolezal, K and Van Staden, J. (2007) 'Optimizing the micropropagation protocol for the endangered Aloe polyphylla : can meta -topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin?', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90, pp. 15–23. doi: 10.1007/s11240-007-9233-4.
- Beel, M. Davis, S. Murphy, J. and Piper, P. (2005) 'Product potential of paulownia timber', *Australian Forestry*, 68(1), pp. 3–8. doi: 10.1080/00049158.2005.10676219.
- Bergmann, B. A. (1998) 'Propagation method influences first year field survival and growth of Paulownia', *New Forests*, 16(3), pp. 251–264. doi: 10.1023/A:1006529622871.
- Bergmann, B. A. and Moon, H. K. (1997) 'In vitro adventitious shoot production in Paulownia', *Plant Cell Reports*, 16(5), pp. 315–319. doi: 10.1007/s002990050230.
- Burger, D. (1989) 'Empress Tree (Paulownia tomentosa Steud.)', *Biotechnology in agriculture and Forestry*, Vol. 5.
- Castellanos, O. and Rodriguez, A. (2006) 'Organogénesis indirecta y enraizamiento in vitro de Paulownia elongata', *Centro de Investigacion y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco*, 4(800), pp. 1–12.
- Chunchukov, A. and Yancheva, S. (2015) 'Micropropagation of paulownia species and hybrids', *Annuaire de l'Université de Sofia "St. Kliment Ohridski"*, 100, pp. 223–230.
- Clatterbuck, K. W. (2005) 'PB1465 Tree Crops for Marginal Farmland - Paulownia.' *The University of Tennessee Agricultural Extension Service*, 05-0012 PB1465-1M-1/05(Rev) E12-4915-00-005-05.



- Corredoira, E., Ballester, A. and Vieitez, A. M. (2008) 'Thidiazuron-induced high-frequency plant regeneration from leaf explants of *Paulownia tomentosa* mature trees', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 95(2), pp. 197–208. doi: 10.1007/s11240-008-9433-6.
- Corredoira, E., Cernadas, M. J. and San José, M. C. (2010) 'Inducción De Yemas Adventicias En *Paulownia tomentosa*. Estudio anatómico del progreso caulogénico', *Revista Real Academia Galega de Ciencias*, XXIX, pp. 5–22.
- Doumett, S. Lamperi, L. Checchini, L. Azzarello, E. Mugnai, S. Mancuso, S. Petruzzelli, G. and Del Bubba, M. (2008) 'Heavy metal distribution between contaminated soil and *Paulownia tomentosa*, in a pilot-scale assisted phytoremediation study: Influence of different complexing agents', *Chemosphere*, 72(10), pp. 1481–1490. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.04.083.
- El-showk, S. and El-showk, N. (2003) 'The *Paulownia* Tree An Alternative for Sustainable Forestry', *Crop Development, Morocco*, pp. 1–8.
- Entsch, B. Letham, D. S. Parker, C. and Summons, R. (1980) 'Metabolites of Cytokinins', in, pp. 109–118. doi: 10.1007/978-3-642-67720-5_11.
- Erbar, C. and Gülden, C. (2011) 'Ontogeny of the flowers in *Paulownia tomentosa* - A contribution to the recognition of the resurrected monogeneric family *Paulowniaceae*', *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. Elsevier GmbH., 206(3), pp. 205–218. doi: 10.1016/j.flora.2010.05.003.
- Essl, F. (2007) 'From ornamental to detrimental? The incipient invasion of Central Europe by *Paulownia tomentosa*', *Preslia*, 79(4), pp. 377–389.
- George, E. F., Hall, M. A. and Klerk, G.-J. (2008) 'Plant Propagation by Tissue Culture.' *Springer*, 3rd Edition.
- Guo-qiang, F. Xiao-qiao, Z. and Cui-juan, Z. (2001) 'Callus induction from leaves of different *Paulownia* species and its plantlet regeneration', *Journal of Forestry Research*, 12(39870631), pp. 209–214. doi: 10.1007/BF02856709.
- Ipekci, Z. and Gozukirmizi, N. (2003) 'Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*', *Plant Cell Reports*, 22(1), pp. 16–24. doi: 10.1007/s00299-003-0650-5.
- Jang, H. R. Hyun Jeong, L. and Shohael, A. M. (2016) 'Production of biomass and bioactive compounds from shoot cultures of *Rosa rugosa* using a bioreactor culture system', *Horticulture Environment and Biotechnology*, 57(1), pp. 79–87. doi: 10.1007/s13580-016-0111-z.
- López, F. Pérez, A. and Zamudio, M. (2012) '*Paulownia* as raw material for solid biofuel and cellulose pulp', *Biomass and Bioenergy*, 45, pp. 77–86. doi: 10.1016/j.biombioe.2012.05.010.



Melhuish, J. H., Gentry, C. E. and Beckjord, P. R. (1990) 'Paulownia tomentosa seedling growth at differing levels of pH, nitrogen and phosphorous', *Journal of Environmental Horticulture*, 8(4), pp. 205–207.

Mok, M. C. Mok, W. S. Armstrog, D. J. Shudo, K. Isogai, Y. and Okamoto, T. (1982) 'Cytokinin activity of N-phenyl-N0 -1,2,3-thiadiazol- 5-ylurea (Thidiazuron).', *Phytochemistry*, 21(7), pp. 1509–1511.

Mosqueda Frómeta, O. Escalona, M. M. Teixeira, J. A. Pina, D. and Daquinta, M. (2017) 'In vitro propagation of *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooker f. in a temporary immersion bioreactor', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer Netherlands, 129(3), pp. 543–551. doi: 10.1007/s11240-017-1186-7.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) 'A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures', *Physiologia Plantarum*, 15(3), pp. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

Ni, X. and Sinica, Y. M.-Y. i hsueh (1982) 'Paulownia stem and leaf culture in vitro', *agris.fao.org*.

Olmedo, J. E. (2017) 'Propagación in vitro de tres especies del género *Paulownia* bajo el sistema de propagación convencional', 25, pp. 69–79.

Radojević, L. (1979) 'Somatic Embryos and Plantlets from Callus Cultures of *Paulownia tomentosa* STEUD.', *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 91(1), pp. 57–62. doi: 10.1016/S0044-328X(79)80066-5.

Rao, C. D., Goh, C. and Kumar, P. P. (1993) 'High frequency plant regeneration from excised leaves of *Paulownia fortunei*', *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 29(2), pp. 72–76. doi: 10.1007/BF02632255.

Taha, S., Ibrahim, M. M. S. and Farahat, M. M. (2008) 'A Micropropagation Protocol of *Paulownia kowakamii* through in vitro culture technique', *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(3), pp. 594–600.

Walker, J. M. and Ditor, S. E. (2009) 'Plant Hormones.' *Springer*, 2nd editio, 149 pp.

Werbrouck, S. P. Strnad, M. Van Onckelen, H. A. and Debergh, P. C. (1996) *Metatoplin, an alternative to benzyladenine in tissue culture?*

Yadav, N. K. Vaidya, B. Henderson, K. Frost, J. and Stewart, W. (2013) 'A Review of *Paulownia* Biotechnology: A Short Rotation, Fast Growing Multipurpose Bioenergy Tree', *American Journal of Plant Sciences*, 4(November), pp. 2070–2082. doi: 10.4236/ajps.2013.411259.

Zhao-Hua, Z. Ching-Ju, C. Xin-Yu, L. Yao-Gao, X. (1986) *Paulownia in China: cultivation and utilization by chinese academy of forestry staff*.

Ziv, M. (1992) *Morphogenic control of plants micropropagated in bioreactor cultures and its possible impact on acclimatization*.